

Gabriela Godoy Poluceno

**GUANOSINA E CANAIS DE POTÁSSIO (BK):
EFEITOS SOBRE A TOXICIDADE GLUTAMATÉRGICA**

Trabalho apresentado ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Carla Inês Tasca

Florianópolis
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Poluceno, Gabriela
Guanosina e Canais de potássio (BK): Efeitos sobre a
toxicidade glutamatérgica / Gabriela Poluceno ;
orientadora, Carla Tasca - Florianópolis, SC, 2016.
54 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
Biológicas. Graduação em Ciências Biológicas.

Inclui referências

1. Ciências Biológicas. 2. Glutamato. 3. Guanosina. 4.
Canais BK. I. Tasca, Carla . II. Universidade Federal de
Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

Gabriela Godoy Poluceno

**GUANOSINA E CANAIS DE POTÁSSIO (BK):
EFEITOS SOBRE A TOXICIDADE GLUTAMATÉRGICA**

Trabalho julgado e aprovado em sua forma final pelos membros
da Banca Examinadora.

Florianópolis, 29 de novembro de 2016

Dra. Maria Risoleta Freire Marques
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

Prof.^a Dr.^a Carla Inês Tasca
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Dr.^a Andreza Fabro de Bem
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Dr.^a Manuella Pinto Kaster
Universidade Federal de Santa Catarina

Dedico este trabalho à minha família,
meus amigos e a todos que contribuíram
de alguma forma.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à toda minha família. Aos meus pais Itamar e Sonia, por me mostrarem que é somente através da educação, do esforço próprio e do respeito, que novos horizontes são conquistados. Aos meus irmãos Igor e Victor, e à minha tia Evilásia, por todo o apoio e carinho. Sem vocês eu não chegaria até aqui.

Agradeço ao meu namorado Victor, por todo o amor e companheirismo, e à todos os meus grandes amigos e amigas que descobri na Biologia. Obrigada por tornarem esta jornada mais fácil.

Agradeço à minha orientadora Dr.^a Carla Inês Tasca por todo o conhecimento e paciência nestes três anos de pesquisa. E à todos e todas meus colegas e amigos do Laboratório de Neuroquímica 4, muito obrigada pela amizade, pelos ensinamentos e pela ajuda nos momentos de dificuldade.

Agradeço ao CNPq pelo financiamento desta pesquisa com bolsa auxílio.

Agradeço a todos e a todas que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Nós somos uma forma do cosmos se
autoconhecer.

(Carl Sagan, 1980)

RESUMO

O glutamato é o neurotransmissor excitatório responsável por processos como memória e aprendizagem. Porém, quando em excesso na fenda sináptica, o glutamato se torna tóxico, caracterizando o processo de excitotoxicidade glutamatérgica, que está envolvido em diversas doenças neurodegenerativas. A guanosina é um nucleosídeo derivado da guanina, a qual exerce efeitos neuroprotetores em diversos modelos de neurotoxicidade, porém, o seu mecanismo de ação ainda precisa ser completamente caracterizado. Os canais de potássio de alta condutância dependentes de cálcio (BK) são ativados com o aumento de íons Ca^{2+} intracelular e com a despolarização da membrana celular, provocando um efluxo de K^+ , e o efeito de sua modulação na neuroproteção da guanosina já foi demonstrado. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito neuroprotetor da guanosina e da ativação dos canais BK em cultura primária de astrócitos hipocampais e fatias hipocampais submetidas à toxicidade glutamatérgica. As culturas astrocíticas de ratos Wistar neonatos (0-2 dias), e as fatias hipocampais, de ratos adultos (90 dias), foram incubadas com glutamato (10 mM) por 1 hora para indução do dano. Em seguida, mantidas por 24 e 4 ou 2 horas, respectivamente, para recuperação, onde foram adicionados o ativador de canal BK NS1619 (10uM) e a guanosina (100uM). Em seguida, avaliou-se a viabilidade celular através do ensaio de redução de MTT, bem como a produção de EROs com a sonda DCFH-DA. Além disso, realizou-se o ensaio de imunocitoquímica para identificação de GFAP e Hoechst nos astrócitos hipocampais. Os resultados obtidos demonstraram que a toxicidade glutamatérgica não causou uma redução significativa na viabilidade dos astrócitos hipocampais, além de não ter sido identificado efeito dos tratamentos utilizados. Porém, a guanosina *per se* exerceu efeito trófico, aumentando a viabilidade celular dos astrócitos. A guanosina *per se* foi capaz de aumentar a imunorreatividade para GFAP, quando comparada aos astrócitos do grupo controle. A incubação das fatias hipocampais com o glutamato não diminuiu a viabilidade. Entretanto, o glutamato induziu um aumento na produção de EROs, e a ativação dos canais BK foi capaz de reverter este efeito. Estes resultados apontam para a possibilidade da guanosina exercer seu efeito neuroprotetor, frente à toxicidade glutamatérgica em astrócitos e em fatias hipocampais, somente quando utilizada como um pré-tratamento. O estresse oxidativo observado possivelmente se deve a excessiva

ativação dos receptores glutamatérgicos responsáveis por gerar um influxo de íons Ca^{2+} intracelular. Enquanto a neuroproteção provocada pela ativação dos canais BK provavelmente se deve ao efluxo de íons K^{+} gerado pela ativação deste canal, com consequente hiperpolarização celular, diminuição dos níveis de Ca^{2+} e o bloqueio da produção de EROs.

Palavras-chave: Glutamato; Guanosina; Canais BK.

ABSTRACT

Glutamate is the responsible neurotransmitter for process such as memory and learning. However, when in excess in the synaptic cleft, glutamate becomes excitotoxic, characterizing the glutamatergic excitotoxicity process, which is related with several neurodegenerative diseases. Guanosine is a nucleoside derived from guanine, which has neuroprotective effects in several neurotoxic models. However, its mechanism of action still needs to be characterized. The high-conductance calcium-activated potassium channels (BK) are activated with the increase of intracellular Ca^{2+} levels and by the cellular membrane depolarization, causing K^{+} efflux, and it has been shown the effect of its modulation in the guanosine neuroprotection. The objective of this study was to evaluate the neuroprotective effect of both guanosine and BK channels activation in primary hippocampal astrocytic culture and in hippocampal slices submitted to glutamatergic toxicity. Astrocytic cell cultures from newborn Wistar rats (0-2 days), and the hippocampal slices obtained from adult rats (90 days), were incubated with glutamate (10mM) for 1 hour to induce the insult. And then, maintained for 24 and 4 or 2 hours, respectively, for recovery, where were added the BK channel activator NS1619 (10uM) and Guanosine (100uM). Next, it was evaluated the cellular viability through the MTT reduction assay, as well as the production of ROS with DCFH-DA probe. In addition, the immunocytochemistry was performed to identify GFAP and Hoechst reactivity in hippocampal astrocytes. The results showed that the glutamatergic toxicity did not cause a significant reduction at the viability of hippocampal astrocytes, also, no effect of both treatments were seen. However, guanosine *per se* exerted trophic effects, increasing significantly the cell culture viability. The hippocampal astrocytes treated with guanosine were able to increase the GFAP immunoreactivity when compared to the astrocytes of the control group. The hippocampal slices incubation with glutamate did not decrease the cellular viability. Nonetheless, glutamate induced an increase in the ROS production of the hippocampal slices, and the BK channels activation was able to revert this effect. This results point to the possibility of guanosine exerting its neuroprotective effect facing the glutamatergic neurotoxicity in astrocytes and hippocampal slices, only when utilized as a pre-treatment. The verified oxidative stress it is probably due to an excessive glutamatergic receptor activation, responsible for generate a Ca^{2+} cellular influx. The neuroprotection provoked by the BK channel activation is probable due to K^{+} efflux,

generated by this channel, consequently provoking cellular hyperpolarization, decrease of intracellular Ca^{2+} levels and the blockade of the ROS production.

Keywords: Glutamate; Guanosine; BK channels.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura molecular do glutamato.....	21
Figura 2 – Sinapse glutamatérgica.....	23
Figura 3 – Catabolismo de purinas da guanina.....	25
Figura 4 – Estrutura molecular do canal de potássio ativado por Ca^{2+} de alta condutância (BK).....	27
Figura 5 – Representação da estrutura molecular do ativador do canal BK, NS1619.....	30
Figura 6 – Representação da estrutura molecular do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) e de seu produto formazan após sua clivagem por desidrogenases mitocondriais.....	31
Figura 7 – Efeito da Guanosina e do NS1619 em culturas de astrócitos hipocampais submetidos a toxicidade glutamatérgica.....	33
Figura 8 – Efeito da guanosina sobre a imunomarcção de GFAP em culturas de astrócitos hipocampais.....	33
Figura 9 – Avaliação dos efeitos da guanosina e do NS1619 na viabilidade de fatias hipocampais submetidas à toxicidade por glutamato.....	34
Figura 10 – Avaliação dos efeitos da guanosina e do ativador NS1619 nos níveis de EROs de fatias hipocampais submetidas à toxicidade por glutamato.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPA - Alfa-amino-3-hidróxi-metilisoxazole-propionato

ATP- Adenosina trifosfato

AVE - Acidente Vascular Encefálico

BK- Canal de K^+ de alta condutância ativado por Ca^{2+}

EAAT- Transportador de aminoácidos excitatórios

EROs - Espécies reativas de oxigênio

GABA- Ácido gama-amino-butírico

GLT-1- Transportador de glutamato 1

GS - Glutamina sintase

GUO - Guanosina

HBSS - Hanks' Balanced Salt Solution

HEK-293 – Human Embryonic Kidney 293 cells

HEPES - Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-piperazin-1-il]-etanossulfônico

KRB - Krebs-Ringer Bicarbonato

MTT - 3-[4,5- Dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolium brometo

NMDA - N- metil-D-aspartato

PGO - Privação de glicose e oxigênio

SNC - Sistema Nervoso Central

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
1.1	Glutamato	20
1.2	Excitotoxicidade glutamatérgica	21
1.3	Astrócitos	22
1.4	Guanosina	24
1.5	Canais BK	26
2	JUSTIFICATIVA	27
3	OBJETIVOS	28
3.1	Objetivo Geral	28
3.2	Objetivos específicos	28
4	MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1	Animais	28
4.2	Preparação e incubação das fatias hipocampais	29
4.3	Preparação das culturas celulares	29
4.4	Protocolo de excitotoxicidade glutamatérgica	29
4.5	Fármacos	30
4.6	Avaliação da viabilidade celular	30
4.7	Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)	31
4.8	Imunocitoquímica	31
4.9	Análise estatística	32
5	RESULTADOS	32
5.1	Avaliação dos efeitos da guanosina e NS1619 em culturas de astrócitos hipocampais submetidos á toxicidade por glutamato	32
5.2	Avaliação dos efeitos da guanosina e do ativador NS1619 na viabilidade de fatias hipocampais submetidas à toxicidade por glutamato	34
5.3	Avaliação dos efeitos da guanosina e do ativador NS1619 nos níveis de EROs de fatias hipocampais submetidas à toxicidade por glutamato	35
6	DISCUSSÃO	37
7	CONCLUSÕES	42
8	PERSPECTIVAS	43
9	REFERÊNCIAS	44

1. INTRODUÇÃO

1.1 Glutamato

O aminoácido L-glutamato (Figura 1) é considerado o principal mediador de sinais excitatórios no Sistema Nervoso Central (SNC) de mamíferos, estando envolvido nos principais aspectos funcionais do cérebro incluindo a cognição, memória e aprendizagem, além de exercer um importante papel no desenvolvimento do SNC, atuando na indução e eliminação de sinapses e na migração, diferenciação e morte celular (Danbolt, 2001). O seu armazenamento ocorre em vesículas localizadas no terminal pré-sináptico, e sob despolarização da membrana pré-sináptica, este neurotransmissor é liberado na fenda, se ligando então aos seus receptores ionotrópicos alfa-amino-3-hidróxi-metilisoxazole-propionato (AMPA), N-metil-D-aspartato (NMDA) e cainato, e metabotrópicos (mGluR1 a mGluR8) localizados no neurônio pós-sináptico. Assim, a ativação de seus receptores iniciará um potencial excitatório pós-sináptico, levando à geração de um potencial de ação (Lewerenz e Maher, 2015).

Devido ao fato de não haverem enzimas extracelulares capazes de degradar o glutamato presente na fenda sináptica (Zhou e Danbolt, 2014), a sua recaptação é dependente dos transportadores de aminoácidos excitatórios (EAATs) localizadas na superfície das células gliais (EAAT1 e EAAT2) e neuronais (EAAT3 e EAAT4) (Popoli *et al.*, 2012). Portanto, uma falha na retirada deste aminoácido da fenda sináptica causará uma ativação excessiva de seus receptores, com consequente abertura prolongada destes canais iônicos ativados por um ligante e uma despolarização neuronal prolongada, provocando assim uma entrada de íons cálcio em excesso na célula (Bano e Nicotera, 2007). Este aumento dos níveis de cálcio intracelular é principalmente provocado pela ativação do subtipo de receptor ionotrópico glutamatérgico NMDA, ocorrendo necessariamente após a ligação de seus dois co-agonistas: os aminoácidos glicina ou D-serina e glutamato. O receptor NMDA possui alta permeabilidade aos íons cálcio (Strong *et al.*, 2014), o que pode acarretar no desbalanço da homeostase celular, levando principalmente à ativação da cascata apoptótica, geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Rueda *et al.*, 2016) e consequente morte neuronal.

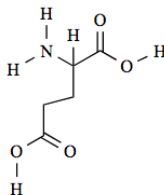


Figura 1. Estrutura molecular do glutamato (Marmioli e Cavaletti, 2012).

1.2 Excitotoxicidade glutamatérgica

A excitotoxicidade glutamatérgica é um evento que tem sido sugerido ocorrer não somente em processos neuropatológicos agudos, como na isquemia cerebral, porém também em processos crônicos (Lewerenz e Maher, 2015), como em algumas doenças neurodegenerativas. No caso da Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA), doença caracterizada por uma severa degeneração dos neurônios motores, verificou-se que, tanto a liberação quanto a captação de glutamato, encontram-se alteradas em um modelo de estudo desta condição patológica (Grigoriev *et al.*, 2016). Esta relação com a excitotoxicidade glutamatérgica também foi verificada nas duas doenças neurodegenerativas mais comuns atualmente, a Doença de Alzheimer (DA) e de Parkinson (DP), bem como no Acidente Vascular Encefálico (AVE).

Diversos mecanismos moleculares envolvidos na modulação de sinapses glutamatérgicas são capazes de induzir neurotoxicidade, como na Doença de Alzheimer, por exemplo, a qual representa a principal causa de demência atualmente (50-75% dos casos) (Pistollato *et al.*, 2016). Neste caso, há uma forte correlação com o acúmulo do peptídeo β -amilóide no tecido nervoso, que por sua vez, atua sobre a modulação do Sistema Xc-, o qual em condições normais é responsável pelo transporte de cistina intracelularmente em troca de glutamato, auxiliando assim na proteção celular contra o estresse oxidativo (Bender *et al.*, 2000). Em modelos da DA verificou-se um aumento da captação glutamatérgica independente de Na^+ conduzida pela atividade reversa do Sistema Xc- em fatias hipocâmpais (Lanznaster *et al.*, 2016a), uma inibição da captação glutamatérgica por células gliais (Harkany *et al.*, 2000), além da modulação direta dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos (NMDA e AMPA) e metabotrópicos (Parameshwaran *et al.*, 2008).

Outro mecanismo correlacionado com uma disfunção na

neurotransmissão glutamatérgica, recorrente em diversas doenças neurodegenerativas, é a ativação excessiva de seus receptores. A Doença de Parkinson é a segunda doença neurodegenerativa mais comum hoje em dia, com prevalência de 0-3% em países industrializados (de Lau e Breteler 2006), e sendo caracterizada pela perda progressiva de neurônios dopaminérgicos na porção do mesencéfalo denominada substância negra, acarretando principalmente em severas disfunções motoras. Em modelos de estudo da DP verificou-se que a modulação de receptores glutamatérgicos metabotrópicos se mostrou eficiente na redução de alguns sintomas da doença (Litim *et al.*, 2016).

Um terceiro processo patológico altamente correlacionado com a toxicidade glutamatérgica é o Acidente Vascular Encefálico (AVE) ou “derrame”. Caracterizado por um déficit neurológico repentino, o AVE isquêmico é comumente causado por uma falência vasogênica no suprimento adequado do tecido cerebral de oxigênio e substratos, responsável por 80-85% de todos os casos de derrame (Chauhan e Debette 2016; Chaves 2000; Flynn *et al.*, 2008). Representando a principal causa neurológica de incapacidade em adultos, o AVE apresenta uma ocorrência de mais de 85% somente em países de baixa e média renda (Johnston *et al.*, 2009). O evento isquêmico provoca uma cascata de reações intracelulares, iniciando-se pela inibição da síntese mitocondrial de adenosina-5'-trifosfato (ATP), prejudicando o funcionamento da bomba de Na^+/K^+ -ATPase e provocando a despolarização da membrana plasmática neuronal, com consequente liberação de potássio para o espaço extracelular e entrada de sódio na célula. Além disso, o nível de íons cálcio intracelular também aumenta, ativando enzimas catabólicas que levarão à morte celular por apoptose ou necrose. E portanto, esta despolarização da membrana neuronal provocará a liberação massiva de neurotransmissores na fenda sináptica (Doyle *et al.*, 2008), com ativação exacerbada de seus receptores. Deste modo, torna-se essencial a investigação de abordagens farmacológicas capazes de modular a transmissão glutamatérgica durante eventos neuropatológicos como estes.

1.3 Astrócitos

Os astrócitos são células gliais fundamentais na manutenção da atividade cerebral. Algumas de suas funções já descritas incluem a síntese de proteínas constituintes da matriz extracelular e de fatores tróficos responsáveis pela maturação neuronal, participação no processo

de formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese), indução e manutenção da barreira hematoencefálica e regulação dos níveis de potássio (K^+) extracelular. Além disso, os astrócitos também são responsáveis pela captação dos neurotransmissores glutamato e do ácido gama-aminobutírico (GABA) da fenda sináptica e sua posterior metabolização (Wang e Bordey, 2009). O glutamato é convertido a glutamina pela atividade da glutamina sintetase (GS), a glutamina é então transportada de volta ao neurônio glutamatérgico para ser hidrolisada em glutamato novamente pela Glutaminase (Popoli *et al.*, 2012) (Figura 2). Ainda sobre o seu envolvimento no suporte metabólico do tecido nervoso, os astrócitos armazenam um estoque de glicogênio que servirá como um repositório de glicose em condições hipoglicêmicas ou de alta demanda energética (Wang e Bordey, 2009). Portanto, considerando o papel essencial que os astrócitos desempenham sobre a manutenção da transmissão glutamatérgica, torna-se imprescindível a investigação dos efeitos causados nestas células quando submetidas a modelos neurotóxicos *in vitro* e *in vivo*, bem como os mecanismos bioquímicos e farmacológicos que atuam na sua regulação.

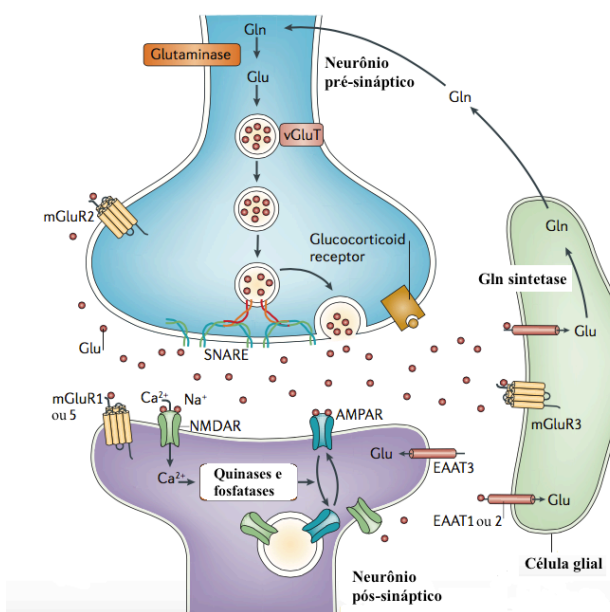


Figura 2. Sinapse glutamatérgica. O glutamato (Glu) neuronal é sintetizado de

novo a partir da glicose (não mostrado) e da glutamina (Gln) fornecida pelas células gliais. O glutamato é então armazenado em vesículas sinápticas por transportadores glutamatérgicos vesiculares (VGluTs). O complexo de proteínas SNARE medeia a interação e fusão das vesículas com a membrana pré-sináptica. Após sua liberação no espaço extracelular, o glutamato se liga a seus receptores ionotrópicos (NMDARs e AMPARs) e metabotrópicos (mGluR1 a mGluR8) nas membranas pós e pré-sinápticas neuronais e gliais. Esta ligação dá início a várias respostas intracelulares, como a despolarização da membrana, ativação de cascatas de sinalização intracelulares e modulação da síntese de proteínas locais. O glutamato é retirado da sinapse por transportadores de aminoácidos excitatórios (EAATs) de células gliais próximas (EAAT1 e EAAT2) e, em menor quantidade, de neurônios (EAAT3 e EAAT4). Dentro da célula glial, o glutamato é convertido em glutamina pela glutamina sintetase e esta glutamina é subsequentemente liberada por um sistema de transportadores de aminoácidos neutros (Sistema N) e captada por neurônios através do sistema de transportadores de aminoácidos acoplados a Na^+ (Sistema A), completando o ciclo glutamato-glutamina. Adaptado de Popoli *et al.*, 2012.

1.4 Guanosina

As purinas são moléculas orgânicas de estrutura aromática que incluem as bases nitrogenadas adenina e guanina, e seus derivados, como os nucleotídeos fosfatados (AMP, GMP, ADP, GDP, ATP e GTP), os nucleosídeos (adenosina e guanosina) e seus metabólitos (inosina, guanina, xantina e ácido úrico) (Figura 3). Além disso, as purinas são constituintes celulares essenciais, exercendo funções de sinalização intra e extracelular em diversos processos fisiológicos (Bettio *et al.*, 2016; Lanznaster *et al.*, 2016b). A guanosina (GUO), portanto, é um nucleosídeo endógeno derivado da guanina, a qual é liberada no SNC pelas células gliais, principalmente pelos astrócitos, tanto em condições basais quanto tóxicas (Ciccarelli *et al.*, 2001).

Diversos estudos já demonstraram seus efeitos neuroprotetores em modelos de neurotoxicidade *in vivo* e *in vitro*. A privação de glicose e oxigênio (PGO) é um modelo de isquemia *in vitro* comumente descrito na literatura. Tanto em fatias hipocâmpais quanto em células de neuroblastoma humano SH-SY5Y submetidas à PGO, verificou-se um efeito neuroprotetor da guanosina frente a este insulto (Olesckovicz *et al.*, 2008; Chang *et al.*, 2008). Já em células astrogliais C6 tratadas com um inibidor do complexo IV da cadeia respiratória, a guanosina foi capaz de reverter os estresses oxidativo e nitrosativo, e além da resposta

inflamatória gerada (Quincozes-Santos *et al.*, 2014). Em ambos os modelos *in vitro* da DP induzida pela toxina 1-metil-4-fenilpiridínio (MPP+), e de DA provocado pela toxicidade de β -amilóide, ambos realizados em células SH-SY5Y, a guanosina foi capaz de reverter a apoptose decorrente destes modelos (Pettifer *et al.*, 2007 e 2004). Em modelos animais de neurotoxicidade, verificou-se o efeito da guanosina prevenindo convulsões induzidas por ácido quinolínico em ratos (Schmidt *et al.*, 2000), além de demonstrar efeito tipo anti-depressivo em camundongos (Bettio *et al.*, 2012).

Além disso, alguns possíveis mecanismos de ação da guanosina também encontram-se descritos. Verificou-se que alguns de seus efeitos ocorrem através da modulação da atividade de transportadores de glutamato, aumentando a captação deste neurotransmissor pelos astrócitos (Frizzo *et al.*, 2001) e diminuindo a captação feita por vesículas sinápticas (Tasca *et al.*, 2004), bem como atuam sobre a proliferação astrocitária (Ciccarelli *et al.*, 2000). Nosso grupo já demonstrou que seu efeito neuroprotetor em fatias hipocâmpais submetidas a PGO ocorre através da modulação da atividade da enzima astrocitária glutamina sintetase (GS) (Dal-Cim *et al.*, 2016) e do controle de vias de sinalização pró-inflamatórias (Dal-Cim *et al.*, 2013).

Entretanto, apesar de seus efeitos estarem bem caracterizados em diversos modelos fisiológicos e neurotóxicos de estudo, uma proteína receptora específica para a GUO ainda não foi identificada. Porém, já foram demonstrados alguns de seus possíveis alvos de interação, como os receptores de adenosina (A_1R e A_2AR) (Schmidt *et al.*, 2010; Dal-Cim *et al.*, 2012), e os canais de potássio, como os canais de K^+ de alta condutância dependentes de cálcio (BK e maxiK) e canais de K^+ retificadores de influxo (Kir) (Dal-Cim *et al.*, 2012; Dal-Cim *et al.*, 2011; Benfenati *et al.*, 2006). Considerando estes indícios, ainda não está claro se a guanosina atua como um neuromodulador em diversos sítios extracelulares de ação, ou se, além destes, possui também seu receptor específico.

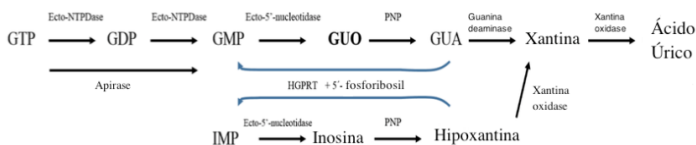


Figura 3. Catabolismo de purinas da guanosina. GTP, GDP e GMP são

hidrolisados sequencialmente por nucleotidasas (ou ecto-nucleotidasas, quando produzidas extracelularmente), gerando a guanosina (GUO). A Ecto-NTPDase (ecto-nucleotídeo difosfohidrolase) metaboliza o GTP e GDP produzindo GMP. A Guanosina é hidrolisada pela enzima PNP (Purina Nucleosídeo Fosforilase) gerando a base púrica guanina (GUA). Através da atividade da guanina deaminase, a guanina é convertida em xantina e subsequentemente em ácido úrico pela ação da xantina oxidase. A enzima da via purinérgica de salvação HGPR (hipoxantina- guanina fosforibosiltransferase) produz GMP ou IMP a partir da condensação da GUA ou hipoxantina, respectivamente, com o 5'-fosforibosil. Adaptado de Lanznaster *et al.*, 2016b.

1.5 Canais BK

Os canais de potássio pertencem a uma diversa família de proteínas de membrana com um importante papel em vários processos fisiológicos como a liberação de neurotransmissores, excitabilidade celular, secreção hormonal e tônus do músculo liso. Dentre estes, os canais de potássio de alta condutância dependentes de cálcio (canais BK), são ativados pelo aumento dos níveis de íons cálcio no citosol e pela despolarização da membrana celular (Ghatta *et al.*, 2006) (Figura 4), sendo altamente distribuídos por todo o cérebro, apresentando alta densidade nos neurônios hipocâmpais (Chen *et al.*, 2013). A abertura destes canais permite um rápido efluxo de íons K^+ , que por sua vez, provoca a hiperpolarização do potencial de membrana e a regulação da excitabilidade da membrana celular, da homeostase iônica, das cascatas de sinalização dependentes de Ca^{2+} e do volume celular. Deste modo, os efeitos resultantes da sua modulação vão desde o controle da homeostase iônica (Yang *et al.*, 2015) e da excitabilidade neuronal até a liberação de neurotransmissores na fenda sináptica (Hu *et al.*, 2001), demonstrando assim ser um importante alvo de estudo na proteção celular.

Já foi demonstrada a participação dos canais BK como mediadores da ação neuroprotetora da GUO. No artigo de Oleskovicz e colaboradores (2008) verificou-se pela primeira vez que o efeito da GUO é dependente da ativação de canais de K^+ em fatias submetidas a PGO. A partir daí, nosso grupo passou a investigar a possível relação da GUO com diversos tipos de canais de K^+ . Dal-Cim e colaboradores (2011) verificaram que, através da inibição farmacológica dos canais BK, mas não dos canais de K^+ dependente de ATP (K_{ATP}) ou dos canais de K^+ de baixa condutância dependentes de Ca^{2+} (SK), o efeito neuroprotetor da GUO sobre a viabilidade celular e a captação glutamatérgica, em fatias hipocâmpais submetidas à PGO, foi

bloqueado. Por conseguinte, o envolvimento dos canais BK no efeito guanosinérgico foi confirmado ao verificar-se que, o bloqueio deste canal em células da linhagem SH-SY5Y submetidas ao estresse oxidativo novamente inibia a neuroproteção da GUO sobre a viabilidade destas células (Dal-Cim *et al.*, 2012).

Além disso, como a manutenção do gradiente iônico transmembrana é fundamental para que ocorra a captação de glutamato da fenda sináptica (Danbolt, 2001), a modulação dos canais BK pela GUO favoreceria o restabelecimento deste gradiente e a consequente funcionalidade dos transportadores glutamatérgicos após um dano excitotóxico (Dal-Cim, 2012). Desta forma, já foi demonstrado que o efeito neuroprotetor da guanosina depende da ativação dos canais BK, no entanto, não se sabe se a ativação dos canais BK diretamente também promove efeito protetor, similar ao observado pela guanosina.

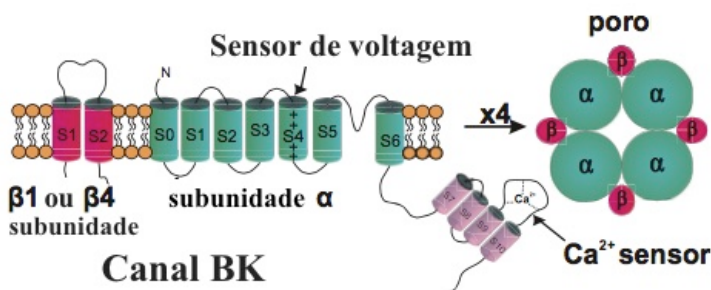


Figura 4. Estrutura molecular do canal de potássio ativado por Ca^{2+} de alta condutância (BK). As quatro subunidades α formam o poro e as quatro subunidades β 1-4 são responsáveis pela regulação da funcionalidade do canal. Adaptado de Petkov, 2014.

2. JUSTIFICATIVA

A população brasileira, assim como da América Latina e do Caribe, vem sofrendo nas últimas cinco décadas uma transição demográfica onde a queda, tanto das taxas de mortalidade quanto de fecundidade, vem aumentando a população de idosos (60 anos e mais) no país (Lebrão, 2009). Portanto, considerando que o risco de incidência das principais doenças neurodegenerativas, como o Alzheimer e o Parkinson, está fortemente associado ao aumento da idade, é extremamente necessário o estudo de processos bioquímicos e moleculares envolvidos, tornando possível o desenvolvimento de

tratamento ou mesmo prevenção. Apesar de os efeitos neuroprotetores da GUO estarem bem caracterizados na literatura científica, tanto em modelos neurotóxicos agudos (isquemia *in vitro* e *in vivo*) e crônicos, quanto em condições fisiológicas atuando sobre a proliferação celular, o seu mecanismo de ação extracelular ainda precisa ser completamente elucidado, o que possibilitaria o seu uso como um possível fármaco no tratamento de neuropatologias envolvidas com a excitotoxicidade glutamatérgica.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar o mecanismo de ação neuroprotetora do nucleosídeo guanosina (GUO), comparando-o com o efeito de um ativador de canais BK, em culturas de células astrocitárias e em fatias de hipocampo submetidas à toxicidade induzida pelo glutamato.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito neuroprotetor da GUO e da ativação dos canais BK em culturas celulares astrocitárias e em fatias hipocampais submetidas ao dano excitotóxico induzido pelo glutamato *in vitro*.
- Avaliar o efeito da ativação dos canais BK na neuroproteção induzida pela GUO na viabilidade celular e na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) de culturas celulares astrocitárias e de fatias hipocampais submetidas ao dano excitotóxico induzido pelo glutamato *in vitro*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos adultos (90 dias ou mais) e neonatos (0-2 dias) de ambos os sexos, mantidos em um ambiente com ciclo claro/escuro de 12h/12h, ventilação e temperatura ambiente controlados ($\pm 25^{\circ}\text{C}$), água e alimento *ad libitum*, obtidos do Biotério

Central da UFSC. Este trabalho foi realizado de acordo com as especificações da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFSC), Protocolo N° PP00955.

4.2 Preparação e incubação das fatias hipocâmpais

Os animais adultos foram decapitados e os cérebros rapidamente dissecados e mantidos em tampão bicarbonato Krebs-Ringer Bicarbonato (KRB) gelado, contendo, em mM: NaCl 122, KCl 3, CaCl₂, 1.3, NaHCO₃ 25, MgSO₄ 1.2, KH₂PO₄ 0.4 e D-glicose 10, e gaseificado com carbogênio (95% O₂ – 5% CO₂) para pH 7.4. A dissecação dos hipocâmpos foi feita neste mesmo tampão. As fatias (400 µm de espessura) foram preparadas usando-se o fatiador de tecidos *McIlwain Tissue Chopper*, separadas em KRB a 4°C e transferidas para uma placa contendo KRB por 30 minutos a 37°C para recuperação antes do início do experimento.

4.3 Preparação das culturas celulares

As culturas celulares astrocíticas primárias foram preparadas a partir de hipocâmpos obtidos de ratos Wistar neonatos (0-2 dias). Estas células foram plaqueadas (3.5×10^4 células) e mantidas até atingirem confluência (7 dias) na presença de meio de cultivo DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Invitrogen, Carlsbad, CA) suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (SBF, Cultilab). As culturas foram incubadas a 37°C na estufa em atmosfera com 5% de CO₂.

4.4 Protocolo de excitotoxicidade glutamatérgica

O dano glutamatérgico foi induzido através da incubação das fatias hipocâmpais e das culturas celulares com glutamato (10mM) diluído em tampão KRB e em HBSS, respectivamente, por 1 hora. Após este período, o meio das fatias hipocâmpais foi substituído por meio de incubação composto por 50% de KRB, 50% de meio de cultivo celular DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco), 20 mM de HEPES (pH 7.4) e 100 µg/mL de gentamicina (meio KRB/DMEM), onde foram mantidas para recuperação por 4 horas. Enquanto que, nas culturas celulares, o tampão foi substituído por meio de cultivo celular DMEM-F12, onde foram mantidas para recuperação por 24 horas.

4.5 Fármacos

Tanto as fatias hipocampais quanto as culturas celulares receberam os tratamentos no início do período de recuperação após o dano excitotóxico com o glutamato. O ativador dos canais BK 1,3-dihidro-1-[2-hidroxi-5-(trifluorometil)fenil]-5-(trifluorometil)-2H-benzimidazol-2-um (NS1619, 10 μ M, Tocris), foi pré-incubado por 15 minutos antes da adição da guanosina (GUO, 100 μ M, Sigma) (Figura 5) ao meio, e foram mantidos juntos durante o período de recuperação de 4 horas, no caso das fatias hipocampais, e de 24 horas nas culturas celulares.

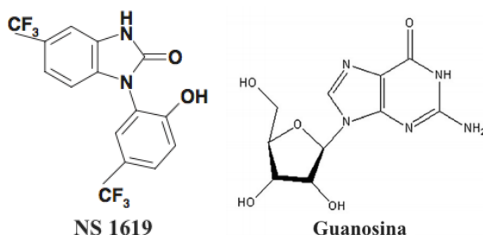


Figura 5. Representação da estrutura molecular do ativador do canal BK, NS1619 (Ghatta *et al.*, 2006) e do nucleosídeo guanosina (Werry *et al.*, 2008).

4.6 Avaliação da viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada através do ensaio de redução do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio, Sigma), o qual é um sal amarelo de tetrazólio solúvel em água, e seu anel tetrazólio pode ser clivado por desidrogenases mitocondriais ativas, produzindo o precipitado de formazan púrpura insolúvel (Jacobsson e Fowler, 1999) (Figura 6). Após os períodos de tratamento, o meio de incubação das culturas celulares foi substituído pela solução de MTT (0.2 mg/ml em tampão PBS 1x) por 2 horas a 37°C, enquanto que as fatias hipocampais foram incubadas com MTT (0.5 mg/ml em tampão KRB) por 20 minutos a 37°C. Após a incubação, o MTT então foi retirado e o precipitado solubilizado com 500 ou 200 μ L de dimetil-sulfóxido (DMSO, Dinâmica), um solvente orgânico, nas células e nas fatias hipocampais, respectivamente. Por fim, a viabilidade celular foi proporcional à leitura da absorbância obtida em espectrofotômetro (Multimode Reader Infinite M200 TECAN) em comprimento de onda de 540 nm.

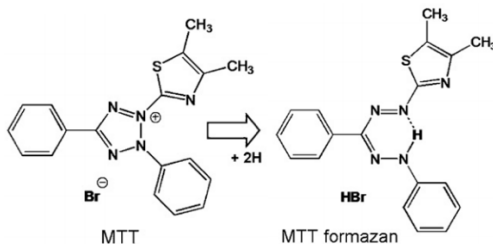


Figura 6. Representação da estrutura molecular do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) e de seu produto formazan após sua clivagem por desidrogenases mitocondriais (Stockert *et al.*, 2012).

4.7 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)

Para avaliação dos níveis de EROs nas fatias hipocâmpais submetidas a excitotoxicidade glutamatérgica foi utilizada a sonda molecular diclorofluoresceína-diacetato (H_2DCFDA) ($80\mu M$, Sigma), a qual se difunde através da membrana celular e é hidrolisada por esterases intracelulares para a forma não-fluorescente diclorofluoresceína (DCFH). Esta, por sua vez, reage com EROs intracelular para formar a diclorofluorescina (DCF), uma sonda verde fluorescente (Dal-Cim *et al.*, 2012). Após o período de recuperação, as fatias foram incubadas com a sonda por 30 minutos, sendo então transferidas para tampão KRB e lidas em espectrofotômetro (Multimode Reader Infinite M200 TECAN), com excitação de 585 nm e emissão de 520 nm.

4.8 Imunocitoquímica

As culturas celulares foram fixadas com 4 % de paraformaldeído por 20 minutos a temperatura ambiente e as células foram permeabilizadas com 0,2 % de Triton X-100 por 15 minutos. Sítios inespecíficos de ligação dos anticorpos foram bloqueados pela incubação das células com 5% de BSA/PBS ou soro por 30 minutos. Depois de fixadas, as células foram incubadas por 24 horas a 4° C em câmara úmida com anticorpo primário anti-GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein*) (Sigma), e em seguida incubadas por 1 hora com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC), a temperatura ambiente. Após três lavagens com PBS as células foram incubadas para co-marcação com Hoechst 33342 (5 µg/mL, Sigma) por 5 minutos, a temperatura

ambiente, para análise do número total de células. As lâminas foram montadas com n-propilgalactosídeo, analisadas e fotografadas em microscópio de fluorescência.

4.9 Análise estatística

A análise estatística foi realizada por análise de variância de uma via (ANOVA), seguida pelo Teste T e Tukey. Os dados foram expressos como média e erro padrão da média (SEM). Foi utilizado o *software* GraphPad Prism 6.0 e os valores com $p < 0,05$ considerados significantes.

5. RESULTADOS

5.1 Avaliação dos efeitos da guanosina e do ativador de BK, NS1619 em culturas de astrócitos hipocampais submetidos à toxicidade por glutamato

Com o objetivo de avaliar o efeito neuroprotetor da guanosina, bem como um possível efeito do ativador do canal BK, NS1619, foi analisada a alteração de viabilidade celular de culturas astrocitárias primárias submetidas ao dano glutamatérgico (Figura 7).

A incubação com glutamato (10 mM) por 1 hora em culturas astrocitárias demonstrou uma tendência em reduzir a viabilidade celular. O tratamento com guanosina, ou guanosina juntamente ao ativador NS1619, demonstraram uma tendência em recuperar a viabilidade das células submetidas a estes tratamentos. Porém, nenhum destes resultados foi estatisticamente significativo (Figura 7A).

Entretanto, quando comparados somente os grupos controle e guanosina, observou-se um aumento significativo na viabilidade das células tratadas com o nucleosídeo (Figura 7-B).

Considerando que já foram demonstrados efeitos tróficos induzidos pela guanosina (Lanznaster et al., 2016b), e afim de avaliar seu efeito na morfologia destas células (7 dias *in vitro*), foi realizado o ensaio de imunocitoquímica para a proteína glial fibrilar ácida (GFAP), um clássico marcador de citoesqueleto de astrócitos, e Hoechst 33342, um marcador de núcleo celular (Figura 8). A análise morfológica das culturas de astrócitos sugere uma maior imunorreatividade para GFAP nas culturas tratadas com guanosina, bem como uma maior

manutenção da viabilidade celular em relação ao grupo controle, através da visualização da marcação nuclear pelo Hoescht 33342.

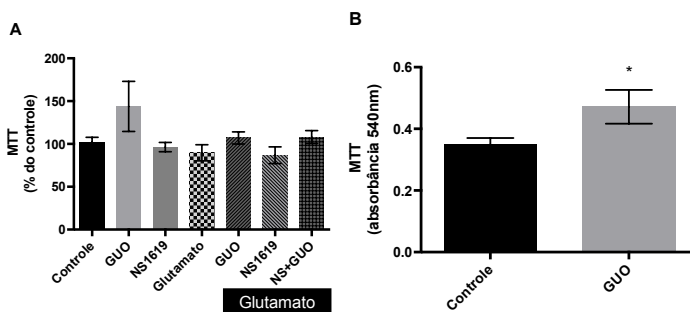


Figura 7. Efeito da Guanosina e NS1619 em culturas de astrócitos hipocâmpais submetidos a toxicidade glutamatérgica. As células astrocitárias foram obtidas do hipocampo de ratos Wistar neonatos (0-2 dias), e após 7 dias de cultivo, ao atingirem confluência, foram tratadas. Os controles foram incubados com tampão HBSS por 1 hora, enquanto que os grupos submetidos ao dano glutamatérgico foram incubados com glutamato (10 mM) pelo mesmo período. Em seguida, os grupos receberam seus respectivos tratamentos, onde a GUO (100 uM), quando co-incubada com o ativador do canal BK NS1619 (10 uM), foi adicionada 15 minutos após o início do período de recuperação de 24 horas. Ao final, foi realizado o ensaio de redução de MTT (0.2 mg/mL) para avaliação da viabilidade celular. Os dados foram expressos como média \pm SEM de três experimentos independentes. * $p < 0.05$ (ANOVA de uma via seguida pelo teste t).

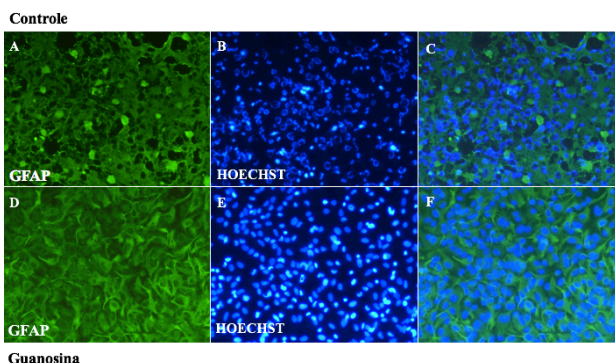


Figura 8. Efeito da guanosina sobre a imunomarcção de GFAP em culturas de astrócitos hipocampus. Em cultura de astrócitos hipocampus com 7 dias *in vitro*, o grupo **Controle (A-C)** permaneceu com meio DMEM-F12 e o grupo **Guanosina (D-F)** com GUO (100uM) por 24 horas, e ao final do período foi realizado o ensaio de imunocitoquímica. Após serem fixadas, as células foram incubadas por 24 horas com anticorpo primário anti-GFAP (**A, D**), e então por 1 hora com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) para posterior co-marcação com Hoechst 33342 (5 µg/mL) (**B, E**) por 5 minutos. As imagens C e F representam a sobreposição das marcações. Representação de um experimento. Aumento de 200x.

5.2 Avaliação dos efeitos da guanosina e do ativador NS1619 na viabilidade de fatias hipocampus submetidas à toxicidade por glutamato

A fim de verificar a viabilidade de fatias hipocampus submetidas à toxicidade causada pela incubação com glutamato (10 mM) por 1 hora, seguida de 4 horas de recuperação em tampão fisiológico, realizou-se o ensaio de redução do MTT (Figura 9).

As fatias submetidas ao dano glutamatérgico demonstraram tendência na redução da sua viabilidade, porém não foi atingida a significância estatística ($p = 0,0707$). Além disso, os tratamentos com GUO e NS1619 *per se*, ou GUO, NS1619, ou GUO + NS1619 após a incubação com glutamato, não alteraram a viabilidade das fatias hipocampus.

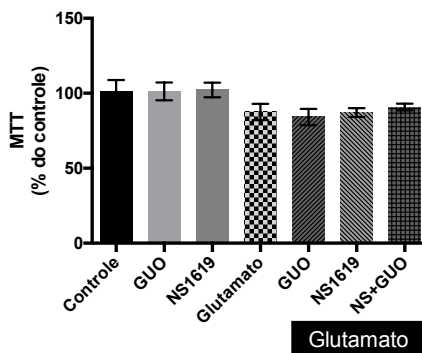


Figura 9. Avaliação dos efeitos da guanosina e do NS1619 na viabilidade de fatias hipocampus submetidas à toxicidade por glutamato. As fatias

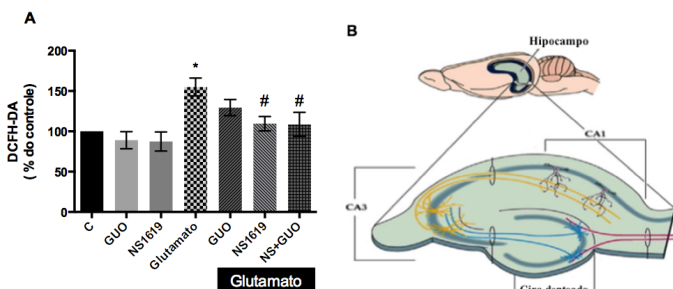
hipocampus obtidas de ratos Wistar adultos (90 dias) foram incubadas com glutamato (10 mM) por 1 hora, sendo que o grupo controle permaneceu com tampão KRB pelo mesmo período, e então foram tratadas com GUO (100 uM) e NS1619 (10 uM). Ao final do período de recuperação de 4 horas, foi realizado o ensaio de redução do MTT (0.5 mg/mL) para avaliação da viabilidade celular. Dados expressos em porcentagem do controle como média \pm erro padrão de cinco experimentos independentes (ANOVA de uma via, seguida do teste de Newman-Keuls).

5.3 Avaliação dos efeitos da guanosina e do ativador de canais BK NS1619 nos níveis de EROs de fatias hipocampus submetidas à toxicidade por glutamato

Com o intuito de avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio nas fatias hipocampus submetidas à toxicidade glutamatérgica, utilizou-se a sonda fluorescente DCFH-DA, através da qual as unidades relativas de fluorescência (URF) detectadas são proporcionais à produção intracelular de EROs (Figura 10).

Os resultados obtidos indicam que o dano glutamatérgico nas fatias provoca um aumento significativo na produção de EROs em relação às fatias controle, e a adição do ativador de canais BK, NS1619, no período de recuperação reverteu significativamente este efeito. Porém, o tratamento com a GUO, apesar de demonstrar uma tendência, não foi capaz de reduzir significativamente a produção de EROs provocada pelo glutamato (Figura 10-A).

Após feita a leitura da fluorescência, as três sub-regiões hipocampus CA1, Giro Denteado (GD) e CA3 (Figura 10-B) foram analisadas no microscópio de fluorescência. Os grupos Controle, Glutamato e Glutamato + NS1619 estão representados na Figura 10-C, onde é perceptível o aumento da fluorescência, principalmente nas regiões CA1 e CA3, do grupo glutamato em relação ao controle.



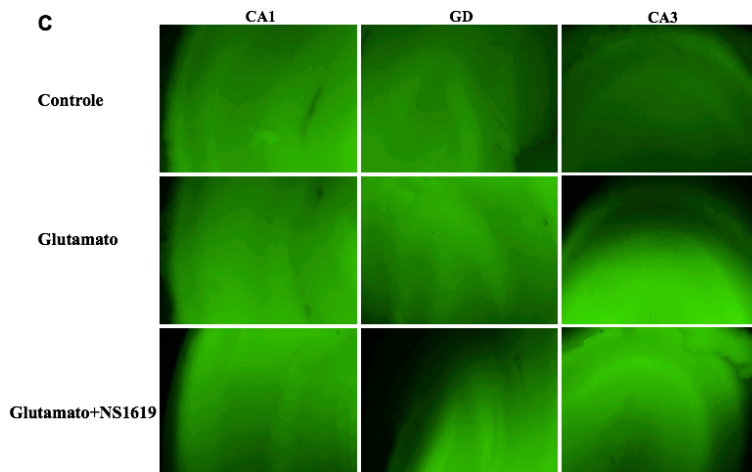


Figura 10. Avaliação do efeito do ativador NS1619 nos níveis de EROs de fatias hipocâmpais submetidas à toxicidade por glutamato. As fatias hipocâmpais obtidas de ratos Wistar adultos (90 dias) foram incubadas com glutamato (10 mM) por 1 hora, e o controle permaneceu com tampão KRB pelo mesmo período, e as fatias então foram tratadas com NS1619 (10 μ M). Ao final do período de recuperação de 2 horas as fatias foram incubadas com a sonda DCFH-DA (80 μ M) para detecção de EROs (A). A figura B esquematiza as três regiões hipocâmpais (adaptado de Patiño *et al.*, 2016) que foram analisadas em microscópio de fluorescência e representadas na figura C após o período de incubação com a sonda. Dados expressos como média \pm SEM de cinco experimentos independentes. * $p < 0.05$, representando média diferente de todos os grupos, com exceção do grupo Glutamato+GUO e # $p < 0.05$, representando média diferente do grupo Glutamato (ANOVA de uma via seguida pelo Teste de Newman-Keuls).

6. DISCUSSÃO

O neurotransmissor glutamato exerce um importante papel em diversas vias metabólicas, assim como na mediação de sinais excitatórios e na plasticidade do sistema nervoso, incluindo a regulação de processos de morte celular. Deste modo, é crucial que o glutamato esteja presente em concentrações ideais no meio extracelular, evitando a estimulação excessiva de seus receptores e por consequência, dos neurônios, o que poderia acarretar num processo de excitotoxicidade

(Zhou e Danbolt, 2014), evento comum em diversas doenças neurodegenerativas.

Estudos de toxicidade induzida pelo glutamato *in vitro* são diversos na literatura científica. Molz e colaboradores (2008), por exemplo, demonstraram que a incubação de fatias hipocâmpais com concentrações milimolares de glutamato por uma 1 hora, é suficiente para reduzir a viabilidade celular e induzir apoptose quando avaliados 6 horas após o dano. Porém, Ludka e colaboradores (2016) observaram que, o dano glutamatérgico na viabilidade celular também é observado no período de 4 horas após a incubação com o glutamato. Já em neurônios corticais, verificou-se que a toxicidade deste neurotransmissor pode ser dependente tanto do tempo de exposição quanto da concentração utilizada, diferenciando-se um dano crônico ou agudo (Ha *et al.*, 2009). Portanto, o estudo de compostos que exerçam ação neuroprotetora, bem como os mecanismos pelos quais agem, frente a este dano, são de extrema importância atualmente.

Considerando o papel que os astrócitos exercem na manutenção dos níveis extracelulares de glutamato, tendo como função a recaptação de grande parte deste neurotransmissor da fenda sináptica (Schmidt *et al.*, 2007), a modulação destas células frente à modelos neurotóxicos torna-se um importante alvo de estudo. Os efeitos tróficos da guanosina, bem como seus mecanismos intracelulares de ação, em culturas astrocitárias, se encontram amplamente caracterizados por diversos grupos de pesquisa. Em modelos de envelhecimento utilizando-se astrócitos corticais, o efeito glioprotetor da guanosina foi verificado através da modulação do metabolismo glutamatérgico, estresse oxidativo e resposta inflamatória (Souza *et al.*, 2016). Podendo também exercer efeito anti-apoptótico através da ativação das vias PI3K/Akt/PKB e MAPK (Di Iorio *et al.*, 2004). E não somente a guanosina, como também outros derivados da guanina, como o GMP, podem exercer efeitos tróficos, atuando tanto na organização de proteínas da matriz extracelular de astrócitos cerebelares (Decker *et al.*, 2007), quanto na estimulação da captação glutamatérgica em astrócitos corticais (Frizzo *et al.*, 2003).

Entretanto, apesar de seus amplos efeitos já descritos, ainda se faz necessário elucidar os mecanismos pelos quais a guanosina age. Nosso grupo de pesquisa demonstrou, em culturas de astrócitos (dados não publicados) e em fatias hipocâmpais (Dal-Cim *et al.*, 2011) submetidos a um modelo de isquemia *in vitro* (Privação de Glicose e Oxigênio- PGO), que os bloqueadores de canais BK, Iberotoxina ou Caribdotoxina, foram capazes de prevenir o efeito neuroprotetor da

guanosina, o que demonstra uma possível participação destes canais na sua ação. Por outro lado, em dados não publicados do nosso grupo, constatou-se que tanto em astrócitos e em fatias corticais, o bloqueio dos canais BK no período de reoxigenação não interfere no efeito neuroprotetor da guanosina. Desta forma, ainda precisamos confirmar se a modulação dos canais BK pela guanosina é específica para algumas regiões cerebrais, ou depende das isoformas de BK expressas nas diferentes regiões.

Portanto, considerando que num evento isquêmico também ocorre excitotoxicidade glutamatérgica provocada pela liberação massiva deste neurotransmissor na fenda sináptica, a partir destes resultados, o objetivo do presente trabalho foi estudar se a ativação dos canais BK interfere (ou é similar) no efeito da guanosina em astrócitos e em fatias hipocampais submetidos à toxicidade por glutamato.

Os canais BK apresentam uma alta distribuição em diversos tipos de tecidos. Nas células do SNC, localizam-se na membrana plasmática de neurônios, onde influenciam na frequência e propagação dos potenciais de ação, bem como na liberação de neurotransmissores dos terminais pré-sinápticos. Enquanto que nos astrócitos, estes canais se encontram principalmente nos processos astrocitais que envolvem o parênquima de vasos sanguíneos. Nestes locais atuam na rápida dilatação de arteríolas intracerebrais consequente da atividade neuronal adjacente (Contet *et al.*, 2016), regulando assim o fluxo sanguíneo cerebral. Além disso, já foi verificada a expressão das subunidades regulatórias BK β 1 e BK β 4 em astrócitos corticais e hipocampais de ratos (Seidel *et al.*, 2011), o que demonstra o importante papel regulatório destas subunidades sobre os canais BK presentes nestas células. Referente à sua distribuição hipocampal, tanto a região do giro denteado (Wanner *et al.*, 1999) quanto as regiões hipocampais CA1, CA2 e CA3 (Sausbier *et al.*, 2006) apresentam uma alta expressão destes canais.

Um dos possíveis modos de avaliar a atividade dos canais BK é através da sua modulação, utilizando-se compostos com efeito bloqueador ou ativador sobre a sua funcionalidade. Os compostos ativadores do canal BK têm como efeito estabilizar a célula devido ao efluxo de íons K⁺ que é gerado, levando à hiperpolarização e consequente diminuição da excitabilidade celular. Um destes compostos, NS1619, possui seletividade para a subunidade funcional BK α do canal (Ghatta *et al.*, 2006), porém, o seu sítio exato de ligação ainda não foi identificado (Bentzen *et al.*, 2014). Já foi demonstrado que o NS1619 induz pré-condicionamento de forma dependente da dose

utilizada, em neurônios corticais, contra toxicidade glutamatérgica (Gáspár *et al.*, 2008). Yan e colaboradores (2015) avaliaram o efeito de um ativador dos canais BK com maior seletividade, o NS11021. Constataram que o seu uso como pré-tratamento em neurônios corticais inibe significativamente a perda de viabilidade, a indução de apoptose e o estresse oxidativo provocados pela toxicidade induzida pelo glutamato. Entretanto, o efeito destes ativadores como tratamento em culturas primárias de astrócitos hipocampus submetidas ao dano glutamatérgico ainda não foi avaliado.

Neste estudo, verificou-se que a indução do dano excitotóxico com glutamato (10 mM) por 1 hora em culturas primárias de astrócitos hipocampus não foi suficiente para acarretar em uma redução significativa da viabilidade celular, e portanto, não foi possível verificar qualquer efeito protetor significativo com os tratamentos seguidos ao dano. Este resultado pode ser devido a uma importante função astrocitária, que é a captação de glutamato (Danbolt *et al.*, 1990). Um estudo prévio do nosso grupo demonstrou que astrócitos cerebelares são suscetíveis à toxicidade por glutamato 10 mM (mesmo protocolo utilizado neste estudo) (Mendes-de-Aguiar, 2008). É possível que os astrócitos hipocampus, agora utilizados, tenham uma capacidade maior de captação, que restringe a indução de toxicidade. Estas diferenças regionais deverão ser confirmadas em experimentos futuros. Alternativamente, como as células foram utilizadas em seu 8º dia de cultivo, é possível que já se observe um declínio da viabilidade celular nas culturas controle, em decorrência do longo período *in vitro*. Tal hipótese é reforçada com a análise da imunocitoquímica do grupo controle, onde é visível tanto a alteração morfológica das células marcadas para GFAP quanto o aumento da fluorescência na marcação para Hoechst. E portanto, considerando que esta é uma sonda capaz de permear a célula e se ligar ao seu DNA, o aumento da fluorescência e a ocorrência de núcleos aparentemente fragmentados, possivelmente indicam células em apoptose (Zhivotovsky e Orrenius, 2001).

Entretanto, quando comparados somente os grupos controle e GUO, verificou-se um aumento significativo na viabilidade deste último grupo, além de uma maior conservação morfológica e elevada marcação para GFAP identificadas por imunocitoquímica. Ciccarelli e colaboradores (2000) demonstraram o efeito da GUO na indução da proliferação de culturas primárias de astrócitos corticais, possivelmente corroborando os resultados obtidos neste trabalho.

Aumentar o número de réplicas deste experimento possibilitaria verificar se tais tendências obtidas se mantêm. Caso contrário, seria

necessária uma alteração no protocolo experimental, onde o tratamento das células passaria a ser feito no dia 6 *in vitro* e as avaliações nas 24 horas seguintes. Além disso, estudos de captação de glutamato serão importantes para avaliar a funcionalidade e diferenças regionais destas culturas astrocitárias.

Já nas fatias hipocâmpais, os resultados obtidos demonstraram que, a incubação das fatias com glutamato (10mM) por 1 hora e incubação por 4 horas em tampão fisiológico não diminuiu significativamente a viabilidade celular. Considerando que trabalhos do nosso grupo já demonstraram este efeito de redução na viabilidade celular induzida por glutamato, tanto após 6 horas (Molz *et al.*, 2011), como após 4 horas de incubação (Ludka *et al.*, 2016), experimentos adicionais são necessários para que se atinja significância estatística, já que neste experimento obteve-se um valor de $P = 0,0707$. Portanto, nenhum dos tratamentos utilizados, GUO (100 μ M) ou NS1619 (10 μ M), exerceu qualquer alteração na viabilidade das fatias. Deste modo, não sendo identificadas alterações significativas na viabilidade celular, foi então avaliado um possível estresse oxidativo induzido pelo glutamato.

As espécies reativas são produzidas constantemente em todos os tecidos, podendo ser geradas com a finalidade de participar de cascatas de sinalização intra e extracelular, ou sendo simplesmente provenientes da cadeia transportadora de elétrons de mitocôndrias danificadas. Devido a sua alta taxa de consumo de O_2 , o cérebro humano é altamente dependente da função mitocondrial eficiente, estando especialmente suscetível a danos oxidativos. E além disso, elevados níveis de glutamato no espaço extracelular podem levar à ativação excessiva de seus receptores, que por sua vez, provocam o aumento de Ca^{2+} intracelular e consequente produção excessiva de óxido nítrico (NO), o qual pode agir sobre as mitocôndrias aumentando ainda mais a produção de espécies reativas (O_2^-) (Halliwell, 2001).

A excitotoxicidade glutamatérgica induzida em fatias hipocâmpais, através da incubação com glutamato 10mM por 1 hora, já foi demonstrada com a diminuição da viabilidade celular, estresse oxidativo e perda do potencial de membrana mitocondrial (Ludka *et al.*, 2016). Além disso, Corte e colaboradores (2012) também estudaram a excitotoxicidade glutamatérgica, porém em diferentes regiões do cérebro de ratos. Seus resultados indicam que o glutamato (1 e 10 mM) induz um aumento significativo nos níveis de EROs, principalmente nas regiões do córtex e hipocampo. Enquanto que, ainda neste trabalho, a guanosina (100 μ M) é capaz de reverter o estresse oxidativo induzido

pelo glutamato 1 mM, porém tendo efeito parcial contra o glutamato 10 mM. Além disso, similar aos resultados obtidos no presente trabalho, neste artigo também constatou-se que o glutamato não foi capaz de diminuir a viabilidade de nenhuma das três regiões analisadas.

Por conseguinte, através do ensaio de fluorescência de DCFH-DA, verificou-se que a exposição das fatias hipocâmpais ao glutamato (10 mM) por 1 hora, seguido de 2 horas de recuperação, causou um aumento significativo na produção de EROs. O tratamento com o ativador NS1619 foi capaz de reverter este dano, ao contrário da GUO, da qual não verificou-se efeito neuroprotetor. Estes resultados corroboram os efeitos do glutamato sobre a indução do estresse oxidativo já descritos na literatura. Neste caso, a ativação excessiva de seus receptores provoca a despolarização da membrana celular, com consequente entrada excessiva de íons Ca^{2+} , provocada principalmente pela ativação de seus receptores ionotrópicos (NMDA e AMPA). Este aumento nos níveis de Ca^{2+} , por sua vez, será responsável por iniciar diversas cascatas de sinalização intracelulares, onde uma delas levará ao aumento da produção de EROs pelas mitocôndrias.

Em relação à GUO, nosso grupo de pesquisa já demonstrou seu efeito neuroprotetor em fatias hipocâmpais submetidas à toxicidade glutamatérgica. Porém, neste caso a GUO foi utilizada como um pré-tratamento, sendo adicionada 30 minutos antes da incubação com o glutamato (1 mM), e co-incubada pelo período de 1 hora com glutamato. Além disso, demonstrou-se que o mecanismo de ação da GUO foi dependente da ativação da via de sinalização celular PI3K/Akt e inativação da via GSK3 β (Molz *et al.*, 2011). Porém, segundo o protocolo utilizado nos experimentos do presente trabalho, a GUO foi utilizada como um pós-tratamento, sendo adicionada no início de cada período de recuperação que se seguia após o dano glutamatérgico. Portanto, considerando que um dos mecanismos de ação da guanosina é agir sobre os transportadores glutamatérgicos, modulando a captação e liberação deste neurotransmissor no meio extracelular, é possível que, ao ser adicionada como pós-tratamento nas fatias já expostas ao glutamato, qualquer proteção que exerça não seja realmente efetiva.

O efeito antioxidante verificado através da ativação dos canais BK, descrito neste trabalho, pode ser explicado pelo *feedback* negativo gerado por estes canais em resposta ao aumento de Ca^{2+} intracelular. Neste caso, ativação dos canais BK gera um contrabalanço na homeostase iônica ao iniciar o efluxo de íons K^{+} , o que hiperpolariza a membrana celular, e por consequência, desativa canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (Bentzen *et al.*, 2014). Assim, ao impedir que

os níveis de Ca^{2+} intracelular continuem aumentando, por consequência a ativação dos canais BK impede que espécies reativas em excesso continuem a serem geradas.

Entretanto, apesar de sua seletividade, já foi verificado que, além de agir nos canais BK, o ativador sintético NS1619 possui um efeito inibitório em canais de Ca^{2+} e de K^+ dependentes de voltagem (K_v) (Holland *et al.*, 1996). Portanto, são necessários estudos complementares que descrevam a ação completa deste composto no SNC. De modo a avaliar a sua especificidade, o mesmo protocolo de dano glutamatérgico poderá ser utilizado, porém adicionando-se à incubação das fatias compostos bloqueadores do canal BK. E além disso, uma segunda possibilidade seria a avaliação de seu efeito como ativador seletivo para BK através de ensaios de eletrofisiologia em células HEK-293 transfectadas com a subunidade funcional do canal BK, metodologia já utilizada por Tasca e colaboradores (2013).

Deste modo, os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que o glutamato não diminuiu a viabilidade de astrócitos hipocampus, porém, verificou-se um possível efeito trófico da GUO *per se* quando comparada ao controle. Nas fatias hipocampus submetidas ao dano glutamatérgico, ainda não foi verificada uma redução significativa na viabilidade celular, bem como nenhum efeito da guanosina ou da ativação dos canais BK. Entretanto, quando avaliada a produção de EROs nas fatias, verificou-se um aumento nos grupos tratados com o glutamato. E neste caso, a modulação dos canais de potássio dependentes de cálcio (BK), utilizando-se o ativador NS1619, foi capaz de reverter este efeito tóxico do glutamato.

7. CONCLUSÕES

- A indução do dano glutamatérgico em culturas primárias de astrócitos hipocampus não é suficiente para diminuir a viabilidade celular de modo significativo. Porém, a guanosina *per se* exerce um possível efeito trófico nestas células.
- A indução do dano glutamatérgico em fatias hipocampus não diminui significativamente a viabilidade celular. A ativação dos canais BK ou o tratamento com a GUO não exerceram qualquer efeito sobre a viabilidade das fatias.

- A indução do dano glutamatérgico em fatias hipocâmpais provoca um aumento significativo na produção de EROs, e a ativação dos canais BK é capaz de reverter este dano oxidativo.

8. PERSPECTIVAS

- Repetir a avaliação da viabilidade de culturas astrocíticas, tratadas com guanosina e NS1619, frente à toxicidade glutamatérgica a fim de confirmar as tendências estatísticas obtidas no presente trabalho. Caso contrário, modificar o protocolo utilizado, passando o tratamento das células para o 6º dia *in vitro* após o plaqueamento.
- Repetir a avaliação da viabilidade de fatias hipocâmpais, tratadas com guanosina e NS1619, frente à toxicidade glutamatérgica a fim de atingir significância estatística.
- Verificar o possível efeito do ativador de canal BK, NS1619, em diferentes regiões do cérebro de ratos, tanto em fatias como em culturas celulares, frente à toxicidade do glutamato.
- Avaliar os níveis de captação de glutamato, tanto em astrócitos quanto em fatias hipocâmpais, submetidos ao dano glutamatérgico e tratados com guanosina e NS1619.
- Avaliar a especificidade do ativador NS1619 em fatias hipocâmpais submetidas à toxicidade glutamatérgica utilizando-se bloqueadores dos canais BK.
- Avaliar o efeito do NS1619 como ativador seletivo através de ensaios de eletrofisiologia em células HEK-293 transfectadas com a subunidade funcional do canal BK.

REFERÊNCIAS

BANO, D.; NICOTERA, P.. Ca²⁺ Signals and Neuronal Death in Brain Ischemia. **Stroke**, [s.l.], v. 38, n. 2, p.674-676, 29 jan. 2007. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1161/01.str.0000256294.46009.29>.

BENDER, AS; REICHEL, W; NOREMBERG, MD. Characterization of cystine uptake in cultured astrocytes. **Neurochemistry International**, v. 37, p. 269-276, 2000.

BENFENATI, V; CAPRINI, M; NOBILE, M; RAPISARDA, C; FERRONI. Guanosine promotes the up-regulation of inward rectifier potassium current mediated by Kir4.1 in cultured rat cortical astrocytes. **Journal Of Neurochemistry**, [s.l.], v. 98, n. 2, p.430-445, jul. 2006. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03877.x>.

BENTZEN, BH; OLESEN, SP; RONN, LCB; GRUNNET, M. BK channel activators and their therapeutic perspectives. **Frontiers In Physiology**, [s.l.], v. 5, p.200-212, 9 out. 2014. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2014.00389>.

BETTIO, L; CUNHA, M; BUDNI, J; PAZINI, F; OLIVEIRA, A; COLLA, A; RODRIGUES, AL. Guanosine produces an antidepressant-like effect through the modulation of NMDA receptors, nitric oxide-cGMP and PI3K/mTOR pathways. **Behavioural Brain Research**, [s.l.], v. 234, n. 2, p.137-148, out. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2012.06.021>.

BETTIO, Luis E. B.; GIL-MOHAPEL, Joana; RODRIGUES, Ana Lúcia S.. Guanosine and its role in neuropathologies. **Purinergic Signalling**, [s.l.], v. 12, n. 3, p.411-426, 22 mar. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s11302-016-9509-4>.

CHANG, R; ALGIRD, A; BAU, C; RATHBONE, M; JIANG, S. Neuroprotective effects of guanosine on stroke models in vitro and in vivo. **Neuroscience Letters**, [s.l.], v. 431, n. 2, p.101-105, jan. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2007.11.072>.

CHAUHAN, Ganesh; DEBETTE, Stéphanie. Genetic Risk Factors for Ischemic and Hemorrhagic Stroke. **Current Cardiology Reports**, [s.l.], v. 18, n. 12, p.100-111, 31 out. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s11886-016-0804-z>.

CHAVES, Márcia. Acidente vascular encefálico: conceituação e fatores de risco. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 7 (4), dezembro de 2000.

CHEN, M; SUN, HY; HU, P; WANG, CF; LI, BX; LI, SJ; LI, JJ; TAN, HY; GAO, TM. Activation of BKCa Channels Mediates Hippocampal Neuronal Death After Reoxygenation and Reperfusion. **Molecular Neurobiology**, [s.l.], v. 48, n. 3, p.794-807, 8 maio 2013. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s12035-013-8467-x>.

CICCARELLI, R; BALLERINI, P; SABATINO, G; RATHBONE, MP; D'ONOFRIO, M; CACIAGLI, F; DI IORIO, P. Involvement of astrocytes in purine-mediated reparative processes in the brain. **Int. J. Devl Neuroscience**, v. 19, p. 395–414, 2001.

CICCARELLI, R; DI IORIO, P; D'ALIMONTE, I; GIULIANI, P; FLORIO, T; CACIAGLI, F; MIDDLEMISS, PJ; RATHBONE, MP. Cultured Astrocyte Proliferation Induced by Extracellular Guanosine Involves Endogenous Adenosine and Is Raised by the Co-Presence of Microglia. **GLIA**, v. 29, p. 202–211, 2000.

CONTET, C; GOULDING, SP; KULJIS, DA; BARTH, AL. BK Channels in the Central Nervous System. **International Review Of Neurobiology**, [s.l.], p.281-342, 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/bs.irm.2016.04.001>.

CORTE, CL; BASTOS, LL; DOBRACHINSKI, F; ROCHA, JBT; SOARES, F. The combination of organoselenium compounds and guanosine prevents glutamate-induced oxidative stress in different regions of rat brains. **Brain Research**, [s.l.], v. 1430, p.101-111, jan. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2011.10.049>.

DAL-CIM, T; LUDKA, FK; MARTINS, WC; REGINATO, C; PARADA, E; EGEE, J; LÓPEZ, MG; TASCA, CI. Guanosine controls inflammatory pathways to afford neuroprotection of hippocampal slices under oxygen and glucose deprivation conditions. **Journal Of**

Neurochemistry, [s.l.], v. 126, n. 4, p.437-450, 17 jun. 2013. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/jnc.12324>.

DAL-CIM, T; MARTINS, WC; SANTOS, ARS, TASCA, C. Guanosine is neuroprotective against oxygen/glucose deprivation in hippocampal slices via large conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels, phosphatidylinositol-3 kinase/protein kinase B pathway activation and glutamate uptake. **Neuroscience**, [s.l.], v. 183, p.212-220, jun. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.03.022>.

DAL-CIM, T; MARTINS, WC; THOMAZ, DT; COELHO, V; POLUCENO, GG; LANZNASTER, D; VANDRESEN-FILHO, S; TASCA, CI. Neuroprotection Promoted by Guanosine Depends on Glutamine Synthetase and Glutamate Transporters Activity in Hippocampal Slices Subjected to Oxygen/Glucose Deprivation. **Neurotoxicity Research**, [s.l.], v. 29, n. 4, p.460-468, 8 fev. 2016. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1007/s12640-015-9595-z>.

DAL-CIM, T; MOLZ, S; EGEA, J; PARADA, E; ROMERO, A; BUDNI, J; MARTÍN DE SAAVEDRA, MD; DEL BARRIO, L; TASCA, CI; LÓPEZ, MG. Guanosine protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells against mitochondrial oxidative stress by inducing heme oxygenase-1 via PI3K/Akt/GSK-3 β pathway. **Neurochemistry International**, [s.l.], v. 61, n. 3, p.397-404, ago. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuint.2012.05.021>.

DAL-CIM, T. Mecanismos de neuroproteção da guanosina contra a neurotoxicidade induzida por isquemia e dano oxidativo mitocondrial *in vitro*. **Tese de Doutorado apresentada á Universidade Federal de Santa Catarina**, 2012.

DANBOLT, N; PINES, G; KANNER, B. Purification and Reconstitution of the Sodium- and Potassium-Coupled Glutamate Transport Glycoprotein from Rat Brain. **Biochemistry**, v. 29, p. 6734-6740, 1990.

DANBOLT, Niels. Glutamate uptake. **Progress in Neurobiology**, v. 65, p. 1–105, 2001.

DE LAU, L; BRETELER, M. Epidemiology of Parkinson's disease.

Lancet Neurology, v. 5, p. 525-35, 2006.

DECKER, H; FRANCISCO, S; MENDES-DE-AGUIAR, CBN; ROMÃO, L; BOECK, C; TRENTIN, A; MOURO-NETO, V; TASCA, C. Guanine derivatives modulate extracellular matrix proteins organization and improve neuron-astrocyte co-culture. **Journal Of Neuroscience Research**, [s.l.], v. 85, n. 9, p.1943-1951, jul. 2007. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/jnr.21332>.

DOYLE, Kristian P.; SIMON, Roger P.; STENZEL-POORE, Mary P.. Mechanisms of ischemic brain damage. **Neuropharmacology**, [s.l.], v. 55, n. 3, p.310-318, set. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.01.005>.

FLYNN, R.w.v.; MACWALTER, R.s.m.; DONEY, A.s.f.. The cost of cerebral ischaemia. **Neuropharmacology**, [s.l.], v. 55, n. 3, p.250-256, set. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.05.031>.

FRIZZO, M; LARA, D; DAHM, K; PROKOPIUK, A; SWANSON, R; SOUZA, D. Activation of glutamate uptake by guanosine in primary astrocyte cultures. **Neuropharmacology and Neurotoxicology**, v. 12, n. 4, Março de 2001.

FRIZZO, M; SOARES, F; DALL'ONDER, L; LARA, D; SWANSON, R; SOUZA, DO. Extracellular conversion of guanine-based purines to guanosine specifically enhances astrocyte glutamate uptake. **Brain Research**, v. 972, p. 84–89, 2003.

GÁSPÁR, T; KATAKAM, P; SNIPES, JA; KIS, B; DOMOKI, F; BARI, F; BUSIJA, DW. Delayed neuronal preconditioning by NS1619 is independent of calcium activated potassium channels. **Journal Of Neurochemistry**, [s.l.], v. 105, n. 4, p.1115-1128, maio 2008. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.05210.x>.

GHATTA, S; NIMMAGADDA, D; XU, X; O'ROURKE, ST. Large-conductance, calcium-activated potassium channels: Structural and functional implications. **Pharmacology & Therapeutics**, [s.l.], v. 110, n. 1, p.103-116, abr. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2005.10.007>.

GRIGORIEV, VV; EFIMOVA, AD; USTYUGOV, AA; SHEVCHENKO, VP; BACHURIN, SO; MYASOEDOV, NF. Glutamate release and uptake processes are altered in a new mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. **Dokl Biochem Biophys**, [s.l.], v. 468, n. 1, p.165-167, maio 2016. Pleiades Publishing Ltd. <http://dx.doi.org/10.1134/s1607672916030017>.

HA, J; LEE, CS; MAENG, JS; KWON, KS; PARK, SS. Chronic glutamate toxicity in mouse cortical neuron culture. **Brain Research**, [s.l.], v. 1273, p.138-143, jun. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2009.03.050>.

HALLIWELL, Barry. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases. **Drugs & Aging**, v. 18 (9), p. 685-716, 2001.

HARKANY, T; ÁBRAHÁM, I; TIMMERMAN, W; LASKAY, G; TÓTH, B; SSAVÁRI, M; KÓNYA, C; SEBENS, JB; KORF, J; NYAKAS, C; ZARÁNDI, M; SOÓS, K; PENKE, B; LUITEN, PGM. b-Amyloid neurotoxicity is mediated by a glutamate- triggered excitotoxic cascade in rat nucleus basalis. **European Journal of Neuroscience**, v. 12, p. 2735-2745, 2000.

HOLLAND, M; LANGTON, P; STANDEN, N; BOYLE, J. Effects of the BK_{Ca} channel activator, NS1619, on rat cerebral artery smooth muscle. **British Journal of Pharmacology**, v.117, p. 119-129, 1996.

HU, H; SHAO, L; CHAVOSHY, S; GU, N; TRIEB, M; BEHRENS, R; LAAKE, P; PONGS, O; KNAUS, H; OTTERSEN, OP; STORM, J. Presynaptic Ca²⁺-Activated K Channels in Glutamatergic Hippocampal Terminals and Their Role in Spike Repolarization and Regulation of Transmitter Release. **The Journal of Neuroscience**, v.21 (24), p. 9585-9597, 2001.

IORIO, P; BALLERINI, P; TRAVERSA, U; NICOLETTI, F; D'ALIMONTE, F; KLEYWEGT, S; WERSTIUK, E; RATHBONE, M; CACIAGLI, F; CICCARELLI, R. The antiapoptotic effect of guanosine is mediated by the activation of the PI 3-kinase/AKT/PKB pathway in cultured rat astrocytes. **Glia**, [s.l.], v. 46, n. 4, p.356-368, 2004. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/glia.20002>.

JACOBSSON, SOP; FOWLER, CJ. Dopamine and glutamate

neurotoxicity in cultured chick telencephali cells effects of NMDA antagonists\ antioxidants and MAO inhibitors.

JOHNSTON, S; MENDIS, S; MATHERS, C. Global variation in stroke burden and mortality: estimates from monitoring, surveillance, and modelling. **Lancet neurology**, v. 8, p. 345-54, 2009.

LANZNASTER, D; DAL-CIM, T; PIERMARTIRI, TCB; TASCA, CI. Guanosine: a Neuromodulator with Therapeutic Potential in Brain Disorders. **Aging And Disease**, [s.l.], v. 7, n. 5, p.657-671, 2016b. Aging and Disease. <http://dx.doi.org/10.14336/ad.2016.0208>.

LANZNASTER, D; MACK, JM; COELHO, V; GANZELLA, M; ALMEIDA, RF; DAL-CIM, T; HANSEL, G; ZIMMER, ER; SOUZA, DO; PREDIGER, RD; TASCA, CI. Guanosine Prevents Anhedonic-Like Behavior and Impairment in Hippocampal Glutamate Transport Following Amyloid- β 1-40 Administration in Mice. **Molecular Neurobiology**, [s.l.], p.300-315, 6 set. 2016a. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s12035-016-0082-1>.

LEBRÃO, ML. Epidemiologia do envelhecimento. **Envelhecimento & Saúde** (Boletim do Instituto de Saúde), Abril de 2009.

LEWERENZ, Jan; MAHER, Pamela. Chronic Glutamate Toxicity in Neurodegenerative Diseases—What is the Evidence? **Front. Neurosci.**, [s.l.], v. 9, p.300-320, 16 dez. 2015. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fnins.2015.00469>.

LITIM, N; MORISSETTE, M; DI PAOLO, T. Metabotropic glutamate receptors as therapeutic targets in Parkinson's disease: An update from the last 5 years of research. **Neuropharmacology**: p. 1-14, 2016.

LUDKA, F; DAL-CIM, T; BINDER, LB; CONSTANTINO, LC; MASSARIA, C; TASCA, CI. Atorvastatin and Fluoxetine Prevent Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction Evoked by Glutamate Toxicity in Hippocampal Slices. **Molecular Neurobiology**, [s.l.], p.300-313, 6 abr. 2016. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1007/s12035-016-9882-6>.

MARMIROLI, P; CAVALETTI, G. The Glutamatergic Neurotransmission in the Central Nervous System. **Current Medicinal**

Chemistry, v. 19, p. 1269-1276, 2012.

MENDES-DE-AGUIAR, CB; ALCHINI, R; DECKER, H; ALVAREZ-SILVA, H; TASCA, C; TRENTIN, A. Thyroid hormone increases astrocytic glutamate uptake and protects astrocytes and neurons against glutamate toxicity. **Journal Of Neuroscience Research**, [s.l.], v. 86, n. 14, p.3117-3125, 1 nov. 2008. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/jnr.21755>.

MOLZ, S; DAL-CIM, T; BUDNI, J; MARTÍN-DE-SAAVEDRA, MD; EGEE, J; ROMERO, A; DEL BARRIO, L; RODRIGUES, AL; LÓPEZ, M; TASCA, C. Neuroprotective effect of guanosine against glutamate-induced cell death in rat hippocampal slices is mediated by the phosphatidylinositol-3 kinase/Akt/ glycogen synthase kinase 3 β pathway activation and inducible nitric oxide synthase inhibition. **Journal Of Neuroscience Research**, [s.l.], v. 89, n. 9, p.1400-1408, 10 jun. 2011. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/jnr.22681>.

MOLZ, S. DECKER, H; DAL-CIM, T; CREMONEZ, C; CORDOVA, F; LEAL, R; TASCA, C. Glutamate-induced Toxicity in Hippocampal Slices Involves Apoptotic Features and p38MAPK Signaling. **Neurochemical Research**, [s.l.], v. 33, n. 1, p.27-36, 7 jul. 2007. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s11064-007-9402-1>.

Neurochemistry International, v. 23, p. 49-62, 1999.

OLESKOVICZ, SPB; MARTINS, WC; LEAL, RB; TASCA, CI. Mechanism of guanosine-induced neuroprotection in rat hippocampal slices submitted to oxygen–glucose deprivation. **Neurochemistry International**, [s.l.], v. 52, n. 3, p.411-418, fev. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuint.2007.07.017>.

PARAMESHWARAN, Kodeeswaran; DHANASEKARAN, Muralikrishnan; SUPPIRAMANIAM, Vishnu. Amyloid beta peptides and glutamatergic synaptic dysregulation. **Experimental Neurology**, [s.l.], v. 210, n. 1, p.7-13, mar. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2007.10.008>.

PATÍÑO, P; PRADA, E; FARRÉ-ALINS, V; MOLZ, S; CACABELOS, R; MARCO-CONTELLAS, J; LÓPEZ, M; TASCA, C; RAMOS, E;

ROMERO, A; EGEA, J. Melatonin protects against oxygen and glucose deprivation by decreasing extracellular glutamate and Nox-derived ROS in rat hippocampal slices. **Neurotoxicology**, [s.l.], v. 57, p.61-68, dez. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2016.09.002>.

PETKOV, Georgi V. Central role of the BK channel in urinary bladder smooth muscle physiology and pathophysiology. **American Journal Of Physiology - Regulatory, Integrative And Comparative Physiology**, [s.l.], v. 307, n. 6, p.571-584, 2 jul. 2014. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpregu.00142.2014>.

PETTIFER, K; JIANG, S; BAU, C; BALLERINI, P; D'ALIMONTE, I; WERSTIUK, E; RATHBONE, M. MPP+-induced cytotoxicity in neuroblastoma cells: Antagonism and reversal by guanosine. **Purinergic Signalling**, [s.l.], v. 3, n. 4, p.399-409, 3 out. 2007. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s11302-007-9073-z>.

PETTIFER, K; KLEYWEGT, S; BAU, C; RAMSBOTTOM, J; VERTES, E; CICCARELLI, R; CACIAGLI, F; WERSTIUK, E; RATHBONE, M. Guanosine protects SH-SY5Y cells against b-amyloid-induced apoptosis. **Neuroreport**, v. 15, n. 5, abril de 2004.

PISTOLLATO, F; OHAYON, E; LAM, A; LANGLEY, G; NOVAK, T; PAMIES, D; PERRY, G; TRUSHINA, E; WILLIAMS, R; ROHER, A; HARTUNG, T; HARNAD, S; BARNARD, N; MORRIS, M; LAI, M; MERKLEY, R; CHANDRASEKERA, C. Alzheimer disease research in the 21st century: past and current failures, new perspectives and funding priorities. **Oncotarget**, [s.l.], p.100-118, 28 jun. 2016. Impact Journals, LLC. <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.9175>.

POPOLI, M; YAN, Z; MCEWEN, BS; SANACORA, G. The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. **Nature Reviews Neuroscience**, [s.l.], p.100-116, 30 nov. 2011. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nrn3138>.

QUINCOZES-SANTOS, A; BOBERMIN, L; SOUZA, DG; BELLAVER, B; GONÇALVES, CA; SOUZA, DO. Guanosine protects C6 astroglial cells against azide-induced oxidative damage: a putative role of heme oxygenase 1. **Journal Of Neurochemistry**, [s.l.], v. 130, n. 1, p.61-74, 24 mar. 2014. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/jnc.12694>.

RUEDA, CB; LLORENTE-FOLCH, I; TRABA, J; AMIGO, I; GONZALEZ-SANCHEZ, P; CONTRERAS, L; JUARISTI, I; MARTINEZ-VALERO, P; PARDO, B; DEL ARCO, A; SATRUSTEGUI, J. Glutamate excitotoxicity and Ca^{2+} -regulation of respiration: Role of the Ca^{2+} activated mitochondrial transporters (CaMCs). **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Bioenergetics**, [s.l.], v. 1857, n. 8, p.1158-1166, ago. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbambio.2016.04.003>.

SAUSBIER, U; SAUBIER, M; SAILER, C; ARNTZ, S; KNAUS, H; NEUHUBER, W; RUTH, P. Ca^{2+} -activated K^{+} channels of the BK-type in the mouse brain. **Histochemistry And Cell Biology**, [s.l.], v. 125, n. 6, p.725-741, 14 dez. 2005. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00418-005-0124-7>.

SCHMIDT, A; BOHMER, AE; SCHALLENBERGER, C; ANTUNES, C; TAVARES, RG; WOFCHUK, ST; ELISABETSKY, E; SOUZA, DO. Mechanisms involved in the antinociception induced by systemic administration of guanosine in mice. **British Journal Of Pharmacology**, [s.l.], v. 159, n. 6, p.1247-1263, 2 fev. 2010. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00597.x>.

SCHMIDT, A; LARA, D; MARASCHIN, J; PERLA, A; SOUZA, DO. Guanosine and GMP prevent seizures induced by quinolinic acid in mice. **Brain Research**, v. 864, p. 40–43, 2000.

SCHMIDT, André P.; LARA, Diogo R.; SOUZA, Diogo O.. Proposal of a guanine-based purinergic system in the mammalian central nervous system. **Pharmacology & Therapeutics**, [s.l.], v. 116, n. 3, p.401-416, dez. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2007.07.004>.

SEIDEL, K; DERST, C; SALZMANN, M; HOLTJE, M; PRILLER, J; MARKGRAF, R; HEINEMANN, S; HEILMANN, H; SKATCHKOV, S; EATON, M; VEH, R; PRUSS, H. Expression of the voltage- and Ca^{2+} -dependent BK potassium channel subunits BK β 1 and BK β 4 in rodent astrocytes. **Glia**, [s.l.], v. 59, n. 6, p.893-902, 24 mar. 2011. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/glia.21160>.

SOUZA, D; BELLAVER, B; BOBERMIN, LD, SOUZA, DO,

QUINCOZES-SANTOS, A. Anti-aging effects of guanosine in glial cells. **Purinergic Signalling**, [s.l.], p.200-210, 1 set. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s11302-016-9533-4>.

STOCKERT, JC; BLÁZQUEZ-CASTRO, A; CAÑETE, M; HOROBIN, RW; VILLANUEVA, A. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. **Acta Histochemica**, [s.l.], v. 114, n. 8, p.785-796, dez. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.acthis.2012.01.006>.

STRONG, KL; JINJ, Y; PROSSER, AR; TRAYNELIS, SF; LIOTTA DC. NMDA receptor modulators: an updated patent review (2013 – 2014). **Expert Opinion On Therapeutic Patents**, [s.l.], v. 24, n. 12, p.1349-1366, 29 out. 2014. Informa Healthcare. <http://dx.doi.org/10.1517/13543776.2014.972938>.

TASCA, C; LLORENTE, J; DAL-CIM, T; FERNÁNDEZ-DUEÑAS, V; GÓMEZ-SOLER, M; GANDÍA, F; CIRUELA, F. The neuroprotective agent Guanosine activates big conductance Ca²⁺-activated Potassium channels (BK) transfected to HEK-293 cells. **Journal of Neurochemistry**, v. 125, p. 273-273, May 2013. ISSN 0022-3042. <http://000316961700641>

TASCA, C; SANTOS, T; TAVARES, R; BATTASTINI, A; ROCHA, J; SOUZA, DO. Guanine derivatives modulate l-glutamate uptake into rat brain synaptic vesicles. **Neurochemistry International**, [s.l.], v. 44, n. 6, p.423-431, maio 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuint.2003.08.001>.

WANG, D; A BORDEY. The astrocyte odyssey. **Progress In Neurobiology**, [s.l.], p.200-256, 1 out. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pneurobio.2008.09.015>.

WANNER, S; KOCH, RO; KOSCHAK, A; TRIEB, M; GARCIA, M; KACZOROWSKI, G; KNAUS, H. High-Conductance Calcium-Activated Potassium Channels in Rat Brain: Pharmacology, Distribution, and Subunit Composition . **Biochemistry**, [s.l.], v. 38, n. 17, p.5392-5400, abr. 1999. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/bi983040c>.

WERRY, TD; LOIACONO, R; SEXTON, PM; CHRISTOPOULOS, A.

RNA editing of the serotonin 5HT_{2C} receptor and its effects on cell signalling, pharmacology and brain function. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 119, p. 7–23, 2008.

YAN, X; GUO, X; JIAO, FY; LIU, X. Activation of large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels inhibits glutamate-induced oxidative stress through attenuating ER stress and mitochondrial dysfunction. **Neurochemistry International**, [s.l.], v. 90, p.28-35, nov. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuint.2015.07.004>.

YANG, Huanghe; ZHANG, Guohui; CUI, Jianmin. BK channels: multiple sensors, one activation gate. **Frontiers In Physiology**, [s.l.], v. 6, p.200-216, 6 fev. 2015. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2015.00029>.

ZHIVOTOVSKY, B; ORRENIUS, S. Assessment of Apoptosis and Necrosis by DNA Fragmentation and Morphological Criteria. **Current Protocols in Cell Biology**, p. 18.3.1-18.3.23, 2001.

ZHOU, Y.; DANBOLT, N. C.. Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. **Journal Of Neural Transmission**, [s.l.], v. 121, n. 8, p.799-817, 1 mar. 2014. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00702-014-1180-8>.